УДК 619:616-084:579.843.95:636.93

А.С. Андрусевич
РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь

КОНСТРУИРОВАНИЕ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ПАСТЕРЕЛЛЕЗА ПУШНЫХ ЗВЕРЕЙ

Вакцинопрофилактика имеет первостепенное значение в защите пушных зверей от различных инфекционных заболеваний. Особенно это важно в отношении болезней, возникающих в звероводческих хозяйствах при концентрации большого поголовья на ограниченных площадях. Вакцина против пастереллеза пушных зверей по серовариантному составу должна готовиться с учетом этиологической структуры заболевания у животных данного вида на данной территории. Проведенные нами исследования по установлению этиологической структуры пастереллеза у пушных зверей на территории Республики Беларусь показали, что эта болезнь вызывается наиболее важными в эпизоотическом отношении пастереллами сероварнантов А и В. С учетом этого для приготовления инактивированной вакцины против пастереллеза пушных зверей мы использовали следующие штаммы пастерелл: штамм Pasteurella multocida серовариант А (КМИЭВ-67) – штамм - антиген, штамм Pasteurella multocida серовариант В (КМИЭВ-68) – штамм – антиген.

Инактивированная вакцина против пастереллеза пушных зверей изготавливалась в условиях РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» в соответствии с разработанным нами ТНПА.

Исследования по получению инактивированной вакцины против пастереллеза пушных зверей проводились в 7 этапов:
1. Реактивация и контроль штаммов
2. Хранение и поддержание производственных штаммов;
3. Получение матровой расплодки;
4. Инактивация;
5. Составление серии вакцины;
6. Расфасовка серии вакцины;
7. Маркировка, упаковка и хранение вакцины;
8. Контроль биопрепарата:
- внешний вид, наличие механических включений;
- стерильность;
- безвредность;
- реактогенность;
- иммуногенность;
- концентрация водородных ионов (pH).

Реактивация и контроль штаммов. Вакцину готовили из штаммов пастерелл: Pasteurella multocida КМИЭВ-67, КМИЭВ -68.

Перед использованием штаммов в производстве их проверяли, на соответствие паспортным данным, на морфологические, культуральные, биохимические свойства. Для этого горлышко ампулы с сухой культурой надпиливали, обжигали над пламенем спиртовки, отламывали и растворяли культуру в 1-2 $см^3$ МПБ, вносили ее в пробирку с мясопептонным бульоном (МПБ) и культивировали в течение 18 часов при температуре от +37 до +38^{0}С. После этого культуру пересевали 2 раза через каждые 6 часов в МПБ. Затем культуру высевали на чашки Петри с 2%-ным МПА для отбора колоний только в «S» форме, с которыми в дальнейшем и вели работу по изучению всех свойств штаммов.

Культуральные свойства:

Культуры пастерелл на МПА в чашках Петри через 18-24 часа культивирования при температуре 37-38^{0}С давали мелкие голубовато-прозрачные колонии «S» формы.

На МПБ пастереллы в первые дни роста вызывали легкое помутнение среды с образованием слизистого осадка через 2-3 суток, который при встряхивании поднимался в виде «косички».

Морфологические свойства:

Морфологию изучали в мазках, окрашенных по Граму из агаровых и бульонных культур. Пастереллы представляли собой неподвижные, грамотрицательные, очень мелкие коккообразные или овальной формы палочки, спор не образовывали. Подвижность определяли посевом в полужидкий агар (ПЖА).

Биохимические свойства:

Сахаролитические свойства пастерелл определяли на жидких питательных средах Гисса с индикатором Андреде.

Пастереллы ферментировали с образованием кислоты без газа глюкозу, галак-

тозу, сахарозу, ксилозу, маннит, сорбит. Не расщепляли раффинозу, мальтозу, арабинозу, дульцит и лактозу.

Протеолитические свойства пастерелл определяли посевом на молоко и мясопептонную желатину. Пастереллы не разжижали желатину, не свертывали молоко. Образовывали индол и сероводород.

Способность образовывать индол и сероводород определяли на бульоне Хоттингера или Мартена. Для этого под пробку пробирки с засеянной культурой помещали две индикаторные бумажки. Если культура выделяла индол, то индикаторная бумажка приобретала сиреневый или малиновый цвет различной интенсивности. При выделении сероводорода бумажка чернела.

Учет биохимических свойств проводили через 1, 2, 3, 5 и 10 суток культивирования пастерелл при температуре от +37 до +38^{0}С.

Хранение и поддержание производственных штаммов. Производственные штаммы хранятся в ампулах при температуре +2 +4^{0}С после лиофильного высушивания в сахароза - желатиновой среде в течение 5 лет. Жизнеспособность поддерживается путем пересева на питательные среды – ПЖА, бульон Хоттингера, МПА на основе перевара Хоттингера 1 раз в течение месяца при условии хранения при +2 +4^{0}С.

Получение матровой расплодки. Штаммы пастерелл засевали в пробирки с бульоном Хоттингера и выращивали при температуре 37^{0}С 18 часов. После окончания культивирования культуру проверяли на чистоту путем микроскопии мазков, окрашенных по Граму.

После инкубации бульонные культуры засевали на агар Хиттингера из расчета 1 пробирка бульонной культуры на матровую колбу.

Засеянные на агар Хиттингера в матрах культуры равномерно распределяли по поверхности агара путем покачивания матр и культивировали в термостате при температуре 37^{0}С в течение 18 часов. Выборочно проводили микроскопический контроль чистоты матровых расплодок.

Культуры смывали с агара из расчета 50 см^3 физиологического раствора на матру. Смытые культуры Pasteurella multocida серовариантов А и В смешивали в соотношении 1:1 в одной стерильной емкости, определяли концентрацию микробных клеток по оптическому стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича и физиологическим раствором доводили содержание микробных клеток до 5 млрд/мл.

Инактивация. Для инактивации пастерелл использовали формалин с содержанием не менее 36% формальдегида. Формалин предварительно разводили дистиллированной водой в соотношении 1:1 и добавляли при постоянном помешивании до конечной концентрации в среде 0,5%.

Инактивацию культур проводили в течение 5-7 суток при температуре от +37 до +42^{0}С.

В процессе инактивации культуры перемешивали в течение 5 минут 2-4 раза в сутки.

Полноту инактивации проверяли путем посева культур на питательные среды в объеме 0,2 см^3 в пробирки с МПБ, МПА. Посевы выдерживали в термостате при температуре от +37 до +38^{0}С в течение 10 суток. Все посевы к процессе культивирования были стерильными.

Составление серии вакцины. К инактивированной смеси культур пастерелл, добавляли 10%-ный раствор алюмокалиевых квасцов до концентрации 10% к объему вакцины. Вакцину подщелачивали 4%-ным раствором гидроокиси натрия до рН 7,0-7,6. Тщательно перемешивали и оставляли на 24 часа при температуре 18-24^{0}С. Затем, брали пробу вакцины и проверяли на стерильность путем посева на питательные среды.

Расфасовка серии вакцины. После установления стерильности (отсутствия роста микрофлоры на питательных средах) вакцину расфасовывали по 50, 100 и 200 см^3 в хорошо промытые стеклянные стерильные флаконы (режим стерилизации Т= +132^{0}С, время 2 часа), плотно закрывали стерильными резиновыми пробками и обкатывали металлическими колпачками (согласно действующим ТНПА).

Маркировка, упаковка и хранение вакцины. На флаконы с вакциной наклеивали этикетку, на которой указывали:
- наименование изготовителя;
- наименование вакцины;
- номинальное количество в см^3;
- номер серии;
- номер контроля;
- дату изготовления;
- срок годности;
- условия хранения;
- обозначение настоящих ТУ BY 600049853.129-2008;
- надписи «Стерильно», «Перед применением взбалтывать», «Для ветеринарии» (рисунок).

Флаконы с вакциной упаковывали в картонные ящики по действующему ТНПА (масса брутто не более 20 кг). Внутрь

каждого ящика вкладывали контрольный листок с указанием:
- наименования вакцины;
- номинального количества в $см^3$ в транспортной таре;
- номера серии;
- даты упаковки;
- номера и фамилии упаковщика.

Каждую единицу потребительской тары снабжали инструкцией по применению.

Маркировали транспортную тару этикеткой, содержащей следующую информацию:
- наименование изготовителя;
- наименование вакцины;
- номер серии;
- номер контроля;
- дата изготовления;
- срок годности;
- обозначение настоящих ТУ BY 600049853.129-2008;
- количество единиц потребительской тары (флаконов) в единице транспортной тары;
- манипуляционные знаки «Верх», «Ограничение температуры» по ГОСТ 14192-96.

Вакцину хранить в сухом, темном помещении при температуре от плюс 2 до плюс 15^0 С.

Контроль биопрепарата. Контроль качества инактивированной вакцины против пастереллеза пушных зверей (исследования внешнего вида, стерильности, безвредности, реактогенности, иммуногенности, определение концентрации водородных ионов) проводили в условиях отдела бактериальных инфекций и вивария РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

Для определения внешнего вида, наличия механических включений, плесени, неразбивающихся конгломератов все флаконы с вакциной встряхивали, просматривали в проходящем свете. Одновременно проверяли правильность маркировки.

Флаконы с вакциной были без трещин, плотно укупорены, содержали жидкость соломенно-желтого цвета с серо-белым осадком, который при встряхивании легко разбивается в гомогенную взвесь, без посторонних механических включений.

Анализ *стерильности* инактивированной вакцины против пастереллеза пушных зверей проводили в соответствии с ГОСТ 28085-89 «Препараты биологические. Методы бактериологического контроля стерильности». Суть опыта заключается в определении отсутствия роста бактериальной и грибковой микрофлоры на питательных средах в посевах из образцов серии биопрепарата.



Рисунок. Инактивированная вакцина против пастереллеза пушных зверей

Роста микрофлоры в пробирках с посевами вакцины не обнаружено, что свидетельствует о стерильности инактивированной вакцины против пастереллеза пушных зверей.

Определение *безвредности* инактивированной вакцины против пастереллеза пушных зверей определяли путем подкожного введения препарата 10-ти белым мышам массой 18-20 г. в дозе 0,5 $см^3$. Животные оставались живыми в течение 10 дней (срок наблюдения), а на месте введения препарата не было отека и некроза тканей.

Реактогенность инактивированной вакцины против пастереллеза пушных зверей устанавливали путем внутримышечного введения 6-и клинически здоровым кроликам в дозе 5 $см^3$ с внутренней стороны бедра и судили по местной и общей реакции организма на введение в течение 10 дней. Через 10 дней после введения препарата проводили убой кроликов, место введения осматривали на наличие остатков вакцины.

В течение наблюдения местной и общей реакции организма на введение препарата не отмечали, остатков вакцины на месте введения не обнаружено.

Проверку *иммуногенных свойств* ина-

Таблица

Иммуногенная активность инактивированной вакцины против пастереллеза пушных зверей

Группы животных	Количество павших животных	Количество выживших животных
1 опытная	1 (10%)	9 (90%)
2 опытная	1 (10%)	9 (90%)
1 контрольная	10 (100%)	-
2 контрольная	10 (100%)	-
3 контрольная	-	10 (100%)

ктивированной вакцины против пастереллеза пушных зверей проводили на 50 белых мышах массой 16-18 г. путем двукратной иммунизации с интервалом 7 дней с последующим заражением. По принципу аналогов из животных сформировали 5 групп (2 опытные и 3 контрольные) по 10 мышей в каждой. Мышей опытных групп иммунизировали вакциной подкожно в дозе 0,3 $см^3$. Напряженность иммунитета определяли через 10 дней после повторной иммунизации путем подкожного заражения животных 18 – часовой бульонной культурой в дозе $2LD_{50}$. Опытных животных 1 группы заражали культурой Pasteurella multocida серовариантом А; 2 группы - Pasteurella multocida серовариантом В; 1 контрольную группу - Pasteurella multocida серовариантом А; 2 контрольную - Pasteurella multocida серовариантом В и животным 3 контрольной группы вводили физиологический раствор по той же схеме. За животными вели наблюдение в течение 10 дней (таблица).

При изучении иммуногенной активности инактивированной вакцины против пастереллеза пушных зверей на лабораторных животных результаты исследований показали, что в опытных группах № 1 и № 2 пало по одной мыши. В контрольных группах № 1 и № 2 отмечали гибель 100% животных, в контрольной группе № 3 – все мыши остались живы.

Таким образом, иммуногенная активность инактивированной вакцины против пастереллеза пушных зверей составила для Pasteurella multocida сероварианта А - 90%, и Pasteurella multocida сероварианта В - 90%.

Концентрацию водородных ионов в вакцине определяли потенциометрическим методом согласно инструкции, приложенной к прибору.

pH вакцины находился в пределах 7,0-7,6, что соответствует требованиям ТНПА.

Выводы

1. Разработанная и приготовленная нами инактивированная вакцина против пастереллеза пушных зверей является стерильным, безвредным, ареактогенным и иммуногенным биопрепаратом.

2. На инактивированную вакцину против пастереллеза пушных зверей, и способ ее получения получен положительный результат предварительной экспертизы Национального центра интеллектуальной собственности при Совете Министров Республики Беларусь на патент.

РЕЗЮМЕ

В данной статье речь идет о способе конструирования инактивированной вакцины против пастереллеза пушных зверей и результатах изучения ее биологических свойств.

SUMMARY

In given article it is a question of a way of designing of the killed vaccine against pasteurellosis fur animals and results of studying of its biological properties.

Литература

1. Азарян С. Л. Изучение реактогенности и иммуногенности противопастереллезных вакцин с различными адъювантами на лабораторных животных // Диагностика, профилактика и меры борьбы с инфекц. и инваз. болезнями с.-х. животных и птиц на Сев. Кавказе: Сб. науч. тр. Новочеркасск, 1990. С. 52-59.
2. Басканьян И.А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами. М.: Медицина, 1992. 192с.
3. Воробьев А. А., Васильев Н. Н. Адъюванты. М.: Медицина, 1969, 206 с.
4. ГОСТ 28085-89 «Препараты биологические. Методы бактериологического контроля стерильности».
5. Медуницын Н. В. Вакцинология. М.: Триада-Х, 1999. 272 с.
6. Carter G. The preparation and use of vaccines for the prevention of pasteurellosis // Can. Vet. J. 1961. N. 2. P. 96.
7. Gilmour N.J. et al. Pasteurellosis vaccines // Pat. 2029219 G.Br. МКИ2А61К39/102.